

α -Amylase로 전분 가수분해를 위한 PEG/Dextran 수성 2상계 구성

박병춘 · 임동준*

영남대학교 공과대학 공업화학과

Formation of PEG/Dextran Aqueous Two-Phase System for Starch Hydrolysis Using α -Amylase

Park, Byoung-Choon and Dong-Joon Lim*

Department of Industrial Chemistry, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — In the polyethylene glycol/dextran aqueous two-phase systems, volume ratio was increased and partition coefficient was decreased with the increase of polyethylene glycol molecular weight and concentration. However the volume ratio was decreased and the partition coefficient was increased with the increase of dextran molecular weight. On the other hand, the volume ratio and the partition coefficient were decreased with the increase of dextran concentration. Continuous enzymatic hydrolysis of soluble starch with α -amylase which was produced by *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 was investigated in polyethylene glycol/dextran aqueous two-phase systems. Nonreacted soluble starch and α -amylase were reused in these systems. α -Amylase activity was maintained more than 100 hrs by recycling of α -amylase from bottom of settler to reactor.

1896년 네덜란드의 미생물학자 Beijerinck가 gelatin과 agar 혹은 gelatin과 soluble starch 용액을 혼합하여 하층에는 대부분의 agar 혹은 starch가 상층에는 대부분의 gelatin이 분배되는 상분리가 일어남을 관찰하였다(1). 한 용액에 polymer를 가하여 상분리가 일어남을 알기 시작한 이래 이러한 현상은 고분자의 비상용성(incompatibility of polymer)이라 불리어 왔다(2). 1947년 Dobry와 Boyer Kawenoki는 여러 polymers들의 혼화성에 대하여 조직적인 연구를 하였다(3, 4). 그러나 생물공학적인 응용은 1956년 스웨덴의 생화학자인 Albertsson에 의하여 세포의 분리에 응용(5)하기 시작한 이래 많은 연구가 되어졌다. 수성 2상계는 식물세포, 동물세포, 미생물, 바이러스, 엽록체, 미토콘드리아, membrane vesicles, 단백질, 핵산, 효소 등의 분리, 회수 및 정제에 응용되어지고 있다(6, 7). 한편 수성 2상계에서 extractive biocon-

version에의 응용은 *Clostridium tetani*에 의한 toxin 생산(8), *Clostridium acetobutylicum*에 의한 acetone과 butanol 생산(9) 및 *Trichoderma reesei*에 의한 cellulase 생산(10) 등이 있으며 α -amylase 생산에의 응용은 1985년 Andersson 등이 polyethylene glycol (PEG)/dextran(DEX) 수성 2상계를 사용하여 *Bacillus subtilis*로부터 α -amylase 생산시 많은 양의 α -amylase를 상층으로, 거의 모든 세포가 하층으로 분배되는 특성을 보았으며, 효소의 생산 수율을 높일 수 있었다(11).

수성 2상계는 물에서 두 수용성 고분자를 혼합함으로써 얻어지는데, 이때 분배계수는 분자량, ionic composition, 분배물질의 종류 및 고분자의 형태 등에 따라 다르다. 고분자 분자량의 영향을 보면, 한 수용성 고분자의 분자량이 감소하면 단백질은 이 고분자가 많은 층으로 모인다. 즉, polyethylene glycol/dextran two-phase system에서 dextran의 분자량이 감소하면 단백질은 더욱 하층으로 모이고, polyethylene glycol의 분자량이 감소하면 단백질은 상층으로 더욱

Key words: Aqueous two-phase system, starch hydrolysis, α -amylase, formation of PEG/dextran

*Corresponding author

모인다(6). 또한 분자량이 작은 단백질이 polyethylene glycol 및 dextran의 분자량의 변화에 영향을 덜 받는다(11). 일반적으로 PEG/DEX 수성 2상계에서 저분자량의 물질은 두 상에 고루 분포되지만 고분자량의 물질은 salts의 첨가에 의해 PEG층으로 다소 이동은 하지만 주로 DEX층으로 모인다(13). 수성 2상계는, 각 상에 85~90%의 물이 함유되며 두 상 사이의 표면장력은 약 0.1 dyne/cm로 매우 적다. 그 결과 mixing이 용이하고 emulsion 상태를 유지한다(14).

고분자 물질을 효소로 분해할 때 담체에 고정화하지 않고 반응을 수행하면 soluble enzyme을 회수시킬 수 없어 재이용할 수 없다. 또한 효소의 활성이 빨리 감소하여 반응시간을 오래 유지시킬 수 없으며 연속적으로 반응을 수행하기에는 많은 어려움이 있다. 이에 1989년 Larsson 등(15)이 수성 2상계를 이용한 α -amylase와 glucoamylase에 의한 전분의 연속 당화 반응계를 고안한 바 있다. 또한 1990년 Hayashida 등(16)이 β -amylase와 glucoamylase에 의한 전분의 연속 당화 반응계를 고안하였으며 glucoamylase를 glutaraldehyde와 cross link하여 분배계수를 낮추었다. 고분자 물질의 효소적 분해에 수성 2상계를 사용하면 효소, 기질, 생산물의 분배특성을 이용하여 일시적인 고정화 systems을 만들 수 있으며, 이렇게 함으로써 담체에 고정화시킨 것보다 확산제한(diffusional restrictions)을 적게 하며 효소와 기질간의 물질전달을 용이하게 할 수 있고 또한 수용성 고분자가 효소의 안정성을 높일 수 있다.

본 연구에서는 α -amylase에 의한 soluble starch의 효소적 가수분해를 위하여 PEG/DEX 수성 2상계 system을 이용하여 반응을 수행함으로써 α -amylase를 유출시키고 않고 reactor내에 존재하게 하여 연속반응의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

α -Amylase

전분의 당화에 사용된 α -amylase(α -1,4-D-glucan glucohydrolase EC 3.2.1.1)는 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141을 최적배지 조건에서 40시간 배양시킨 후 6,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액으로 하였다.

환원당과 α -amylase activity 측정

환원당의 정량과 α -amylase activity 측정은 DNS 방법(17, 18)을 사용하였으며, α -amylase activity는 원심분리된 용액을 37°C에서 2% 가용성 전분(soluble starch)에 작용시켜 1분 동안 생성된 환원당의 μ mole로 unit를 정의한다.

PEG/DEX 수성 2상계에서 체적비와 분배계수 측정

시험관에 polyethylene glycol(PEG)과 dextran (DEX)을 각각 가한 후 20배 희석한 α -amylase solution을 4 ml 가한다. 이 용액을 vortex로 약 1분간 혼합하고 5 ml들이 mass cylinder에 따른다. 37°C water bath에 약 20분간 방치한 후 상분리가 완전히 일어나면 체적비(volume ratio)를 측정한다. 상층 및 하층에서 각각 0.1 ml씩 용액을 채취하여 DNS 방법으로 α -amylase activity를 측정하여 분배계수(K)를 구하였다.

가용성 전분의 연속 가수분해

수성 2상계를 이용한 가용성 전분의 연속 가수분해를 수행한 장치를 Fig. 1에 나타내었다. 모든 실험은 37°C 항온조에서 수행하였다. Reactor에 polyethylene glycol이 120 g/l, dextran이 100 g/l, 가용성 전분이 20 g/l되게 가한 후, 0.02 M phosphate buffer로서 pH

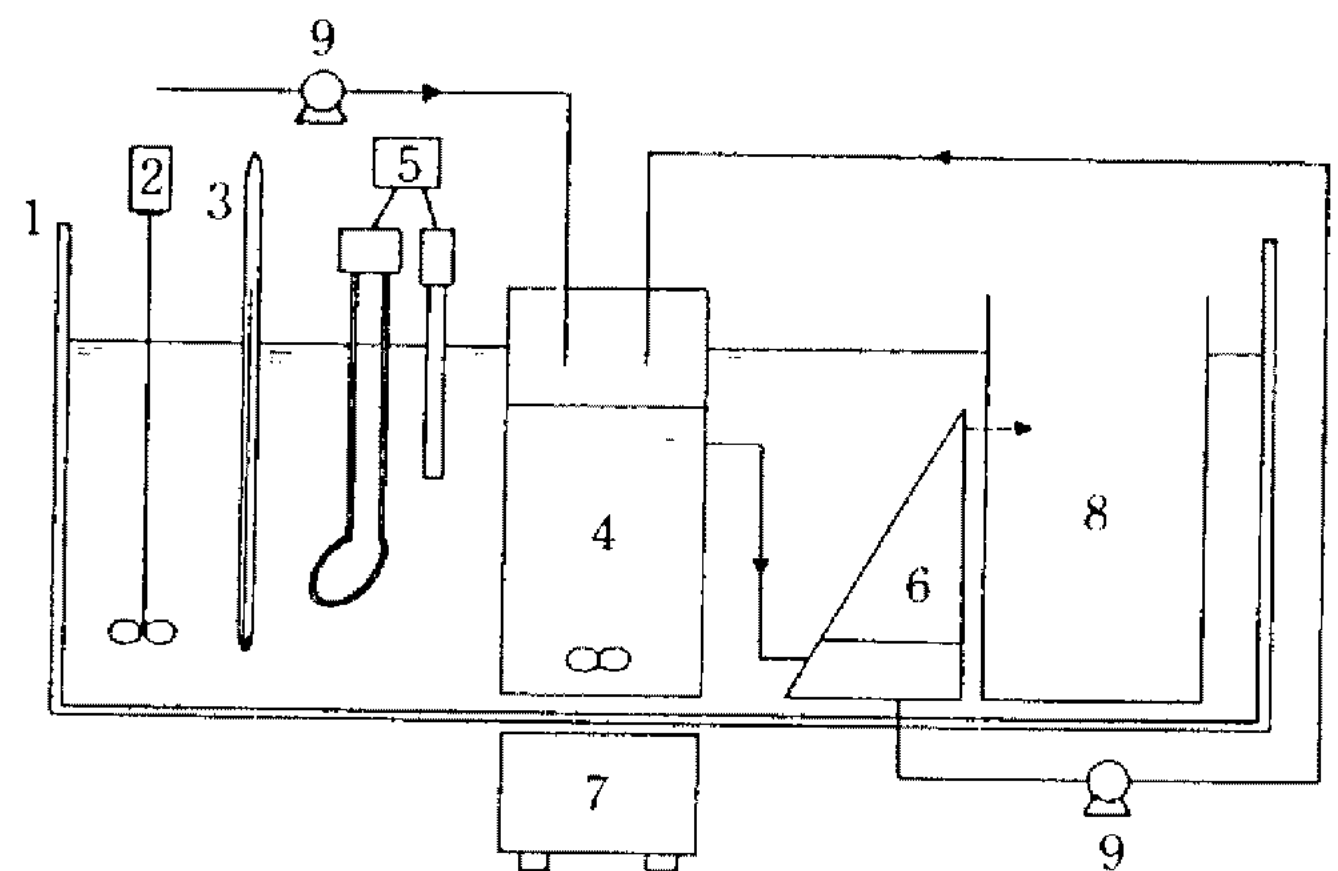


Fig. 1. Experimental apparatus for the continuous hydrolysis of soluble starch by α -amylase in aqueous two-phase systems.

- 1. Water bath (37°C)
- 2. Stirrer
- 3. Thermometer
- 4. Reactor
- 5. Temperature control unit
- 6. Settler
- 7. Magnetic stirrer
- 8. Sampling bottle
- 9. Peristaltic pump

6.9로 맞추고 α -amylase와 안정제로서 CaCl_2 를 0.1 g/l되게 첨가하였다. Magnetic stirrer를 이용하여 100 rpm으로 mixing하면서 반응시킨다. Reactor의 working volume을 100 ml로 하였으며, settler의 용량을 50 ml로 하였다. 그리고 20 g/l 가용성 전분과 120 g/l의 polyethylene glycol을 0.02 M phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 기질을 peristaltic pump를 이용하여 유속 0.2 ml/min로 reactor에 공급하고 동시에 동일한 속도로 polyethylene glycol과 생성물을 settler의 상층으로부터 연속적으로 유출시켰다. 또한 settler로부터 미반응 starch와 α -amylase를 포함하는 DEX층 (bottom phase)을 peristaltic pump를 이용하여 유속 0.625 ml/min로 reactor에 연속적으로 재순환시켰다.

결과 및 고찰

PEG/DEX 수성 2상계에서 α -amylase 분배 특성 수성 2상계를 이용한 가용성 전분의 연속 가수분해를 수행하기 위하여 polyethylene glycol(PEG: Fluka)의 분자량과 농도 및 dextran(DEX: Sigma)의 분자량과 농도에 따른 체적비(top phase volume/bot-

tom phase volume)와 분배계수(K, top phase α -amylase activity/bottom phase α -amylase activity)의 관계를 고찰하였다.

Fig. 2는 각각의 시험관에 분자량이 38,800인 DEX를 0.4g씩 넣고 분자량이 4,000, 6,000, 8,000인 PEG를 0.4g씩 달리 넣은 뒤 20배 희석된 α -amylase 용액을 4 ml씩 넣어서 체적비와 분배계수를 구하여 나타내었으며, 또한 분자량이 77,800인 DEX를 위와 같이 동일하게 하여 구한 결과를 동시에 나타내었다. 여기서 PEG의 분자량이 증가할수록 체적비는 증가하고 분배계수(K)는 감소함을 보였다. Fig. 3은 시험관에 DEX 38,800과 DEX 77,800을 0.32g씩 따로 넣고 PEG 6,000을 각각 0.24, 0.32, 0.40, 0.48g씩 첨가한 후 α -amylase 용액을 4 ml씩 가하여 PEG농도가 각각 60, 80, 100, 120 g/l되게 변화시켰을 때 체적비와 분배계수를 구하여 나타내었다. 여기서 PEG의 농도가 증가할수록 체적비는 커지고 분배계수는 감소하였다. 한편 Fig. 3에서 80 g/l 농도의 DEX 38,800과 60 g/l 농도의 PEG 6,000 사이에서는 두 상으로 상분리가 되지 않았다. 그러나 80 g/l 농도의 DEX 77,800과 60 g/l 농도의 PEG 6,000 사이에서는 상분리가 되었다. 이는 PEG 농도가 붙어지고 DEX 분자량이 적어지면

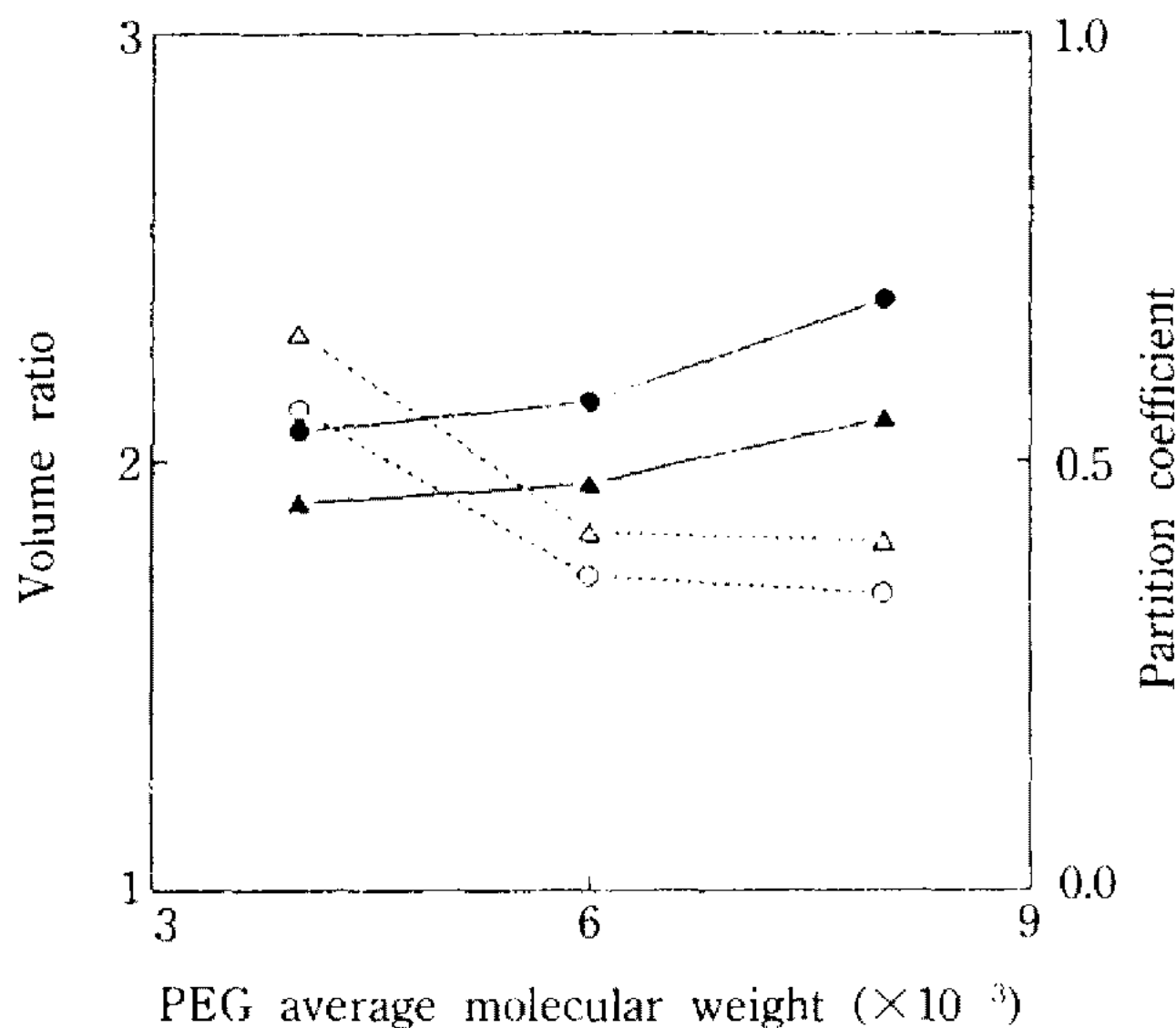


Fig. 2. Effect of PEG average molecular weight on the partition coefficient of α -amylase and volume ratio of two-phase.

The two-phase system was made of 100 g/l PEG and 100 g/l DEX.

- : Partition coefficient, DEX 38,800
- : Volume ratio, DEX 38,800
- △: Partition coefficient, DEX 77,800
- ▲: Volume ratio, DEX 77,800

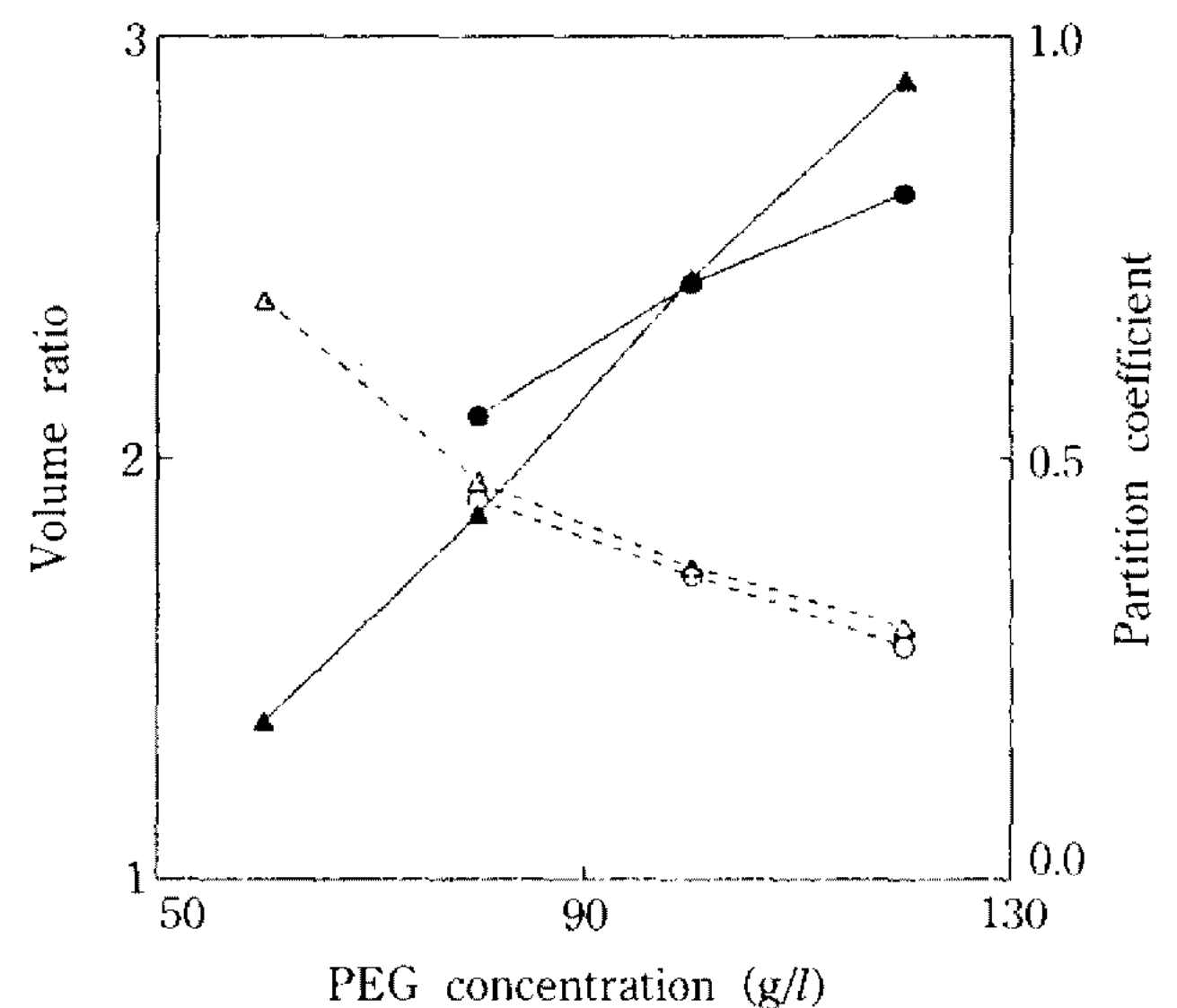


Fig. 3. Effect of PEG concentration on the partition coefficient of α -amylase and volume ratio of two-phase.

The two-phase system was made of PEG 6,000 and 80 g/l DEX.

- : Partition coefficient, DEX 38,800
- : Volume ratio, DEX 38,800
- △: Partition coefficient, DEX 77,800
- ▲: Volume ratio, DEX 77,800

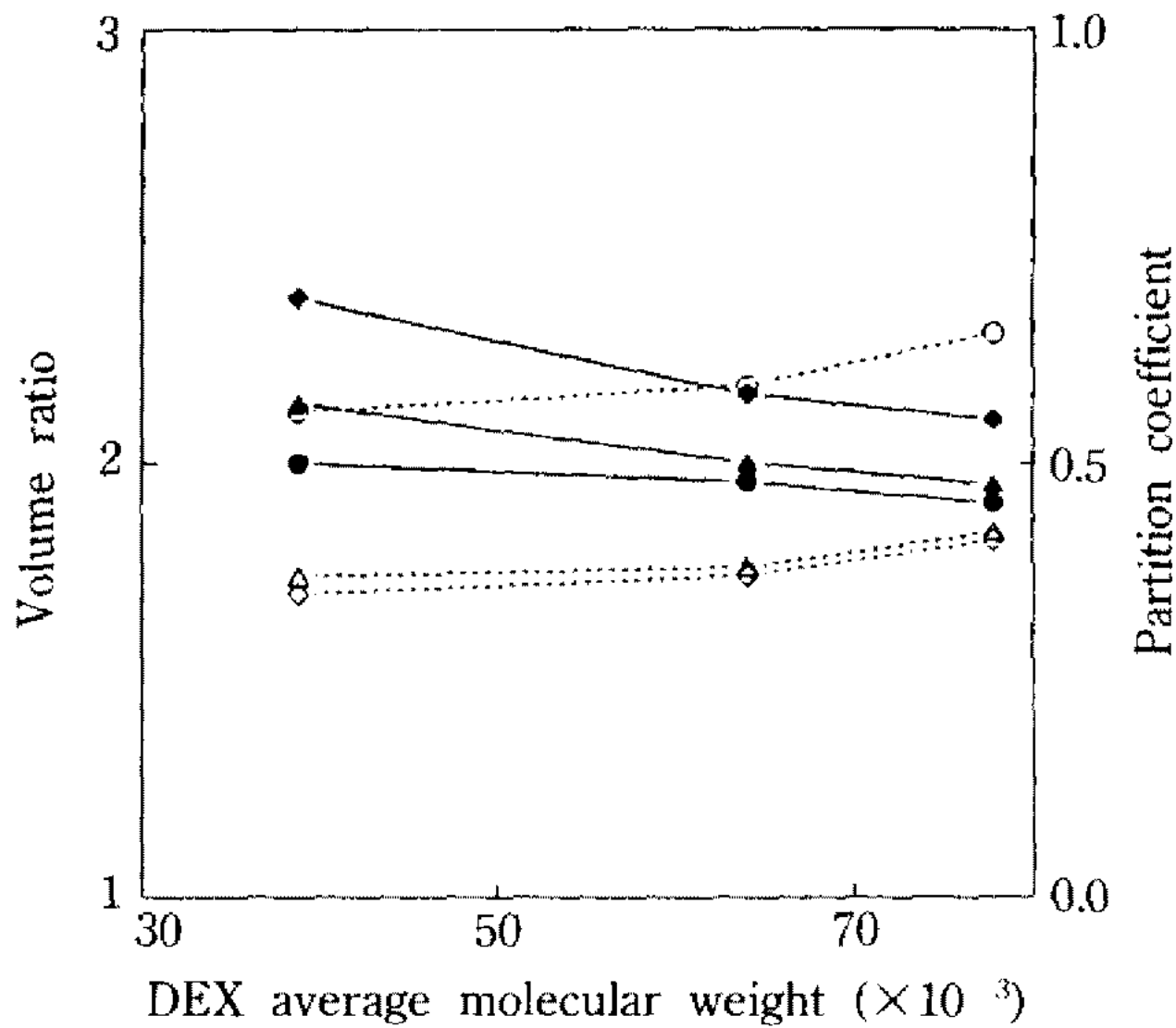


Fig. 4. Effect of DEX average molecular weight on the partition coefficient of α -amylase and the volume ratio of two-phase.

The two phase system was made of 100 g/l PEG and 100 g/l DEX.

- : Partition coefficient, PEG 4,000
- : Volume ratio, PEG 4,000
- △: Partition coefficient, PEG 6,000
- ▲: Volume ratio, PEG 6,000
- ◇: Partition coefficient, PEG 8,000
- ◆: Volume ratio, PEG 8,000

두 수용성 고분자가 서로 섞여 분자간의 친화력이 증가하여 상분리가 되지 않는 것으로 사료된다. 위 실험결과들로부터 수성 2상계를 이용한 전분의 연속 당화 실험시 분자량이 큰 PEG와 고농도의 PEG를 사용할수록 낮은 K값을 얻을 수 있어 α -amylase를 DEX층에 보낼 수 있다.

Fig. 4는 분자량이 4,000, 6,000, 8,000인 PEG를 0.4 g씩 각각 다른 시험관에 넣고 분자량이 각각 다른 DEX를 0.4g씩 따로 첨가한 후 희석된 α -amylase 용액을 가하여 PEG와 DEX의 농도가 100 g/l되게 한 후 DEX 분자량에 따른 체적비와 분배계수를 측정하여 나타낸 것이다. 여기서 DEX의 분자량이 38,800으로 적어질수록 체적비는 증가하고 분배계수는 커짐을 보였으며, 특히 PEG의 분자량이 8,000으로 증가할 때 이 값들이 더욱 커졌다. Fig. 5는 각각의 시험관에 PEG 6,000을 0.32g씩 넣고 DEX 38,800을 0.24, 0.32, 0.40, 0.48g, DEX-77,800을 0.24, 0.32, 0.40, 0.48 g씩 따로 가한 후 희석된 α -amylase 용액을 4 ml씩 넣어서 DEX농도가 60, 80, 100, 120 g/l되게 하였을 때의 체적비와 분배계수를 나타낸 것이다. 여기서 80

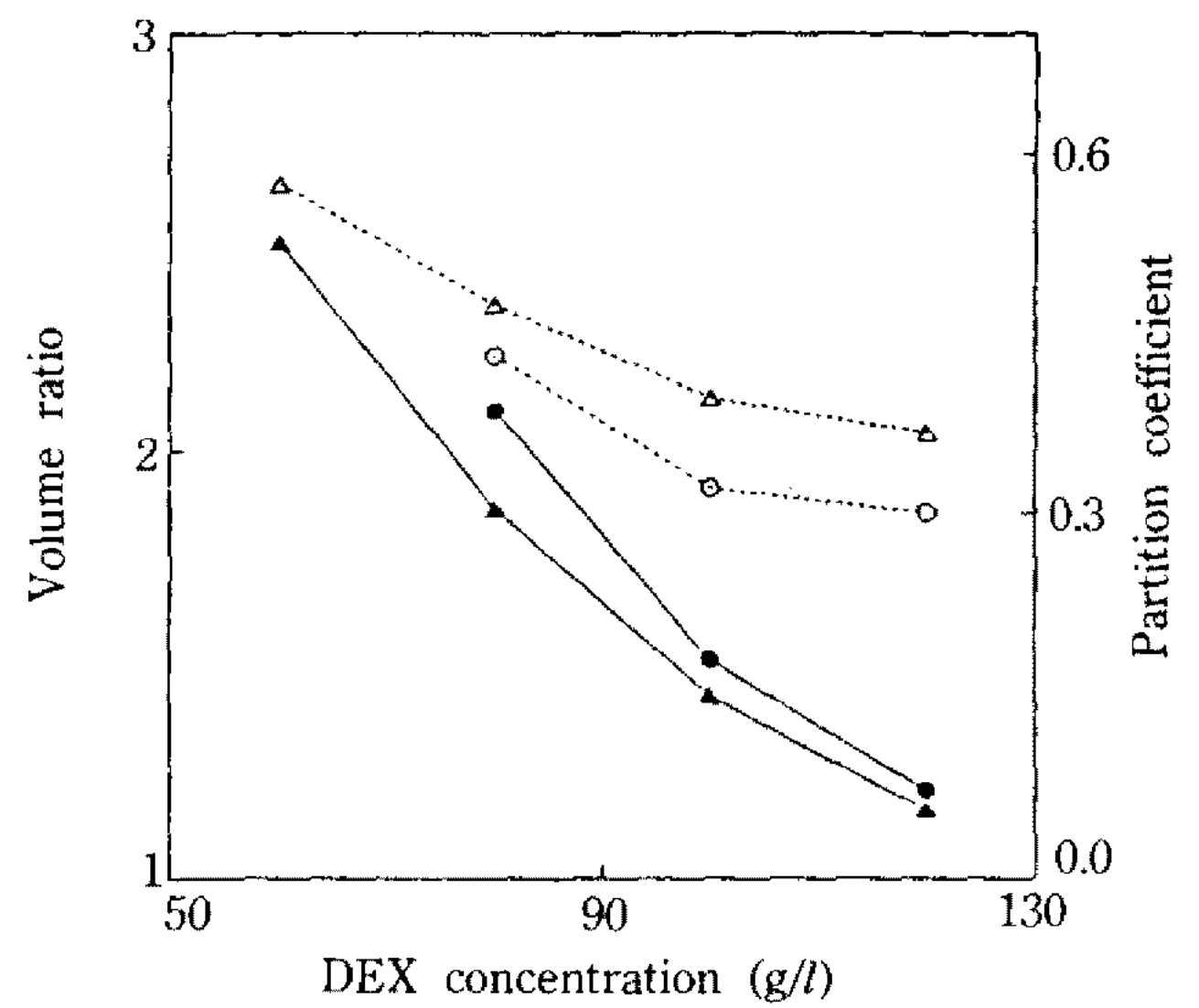


Fig. 5. Effect of DEX concentration on the partition coefficient of α -amylase and the volume ratio of two-phase.

Two-phase system was made of 80 g/l PEG 6,000 and various concentrations of DEX.

- : Partition coefficient, DEX 38,800
- : Volume ratio, DEX 38,800
- △: Partition coefficient, DEX 77,800
- ▲: Volume ratio, DEX 77,800

g/l 농도의 PEG 6,000과 DEX 38,800의 농도가 60 g/l일 때는 체적비와 분배계수값이 나타나 있지 않는데 이것은 80 g/l 농도의 PEG 6,000과 DEX를 혼합하였을 때 DEX 분자량이 38,800으로 적어지면서 DEX 농도가 60 g/l로 묽어질수록 두 수용성 고분자가 서로 잘 섞이고 두 고분자간의 친화력이 증가하여 두 상으로 분리가 되지 않는 것으로 생각되어진다. 한편 DEX농도가 120 g/l로 증가할수록 체적비와 분배계수값이 다같이 감소함을 보였는데 이는 DEX농도가 커질수록 α -amylase가 DEX층(하층)으로 이동함을 의미한다. Fig. 4와 Fig. 5에서 낮은 분배계수를 얻기 위해서는 비교적 저분자량과 비교적 고농도의 DEX가 요구되어진다. 그러나 고농도의 DEX는 점도가 커서 효소를 이용한 α -amylase 생성에 이용되기에는 문제점이 있을 것으로 생각되어진다.

수성 2상계를 이용한 전분의 연속적 가수분해

PEG/DEX 수성 2상계를 이용하여 가용성 전분을 연속적 가수분해로 반응을 수행하여 Fig. 6에 나타내었다. 이때 사용된 PEG는 분자량이 6,000이며 농도는 120 g/l로 하였으며 DEX는 분자량이 각각 38,800, 77,800으로 하고 농도를 100 g/l되게 하였다. DEX

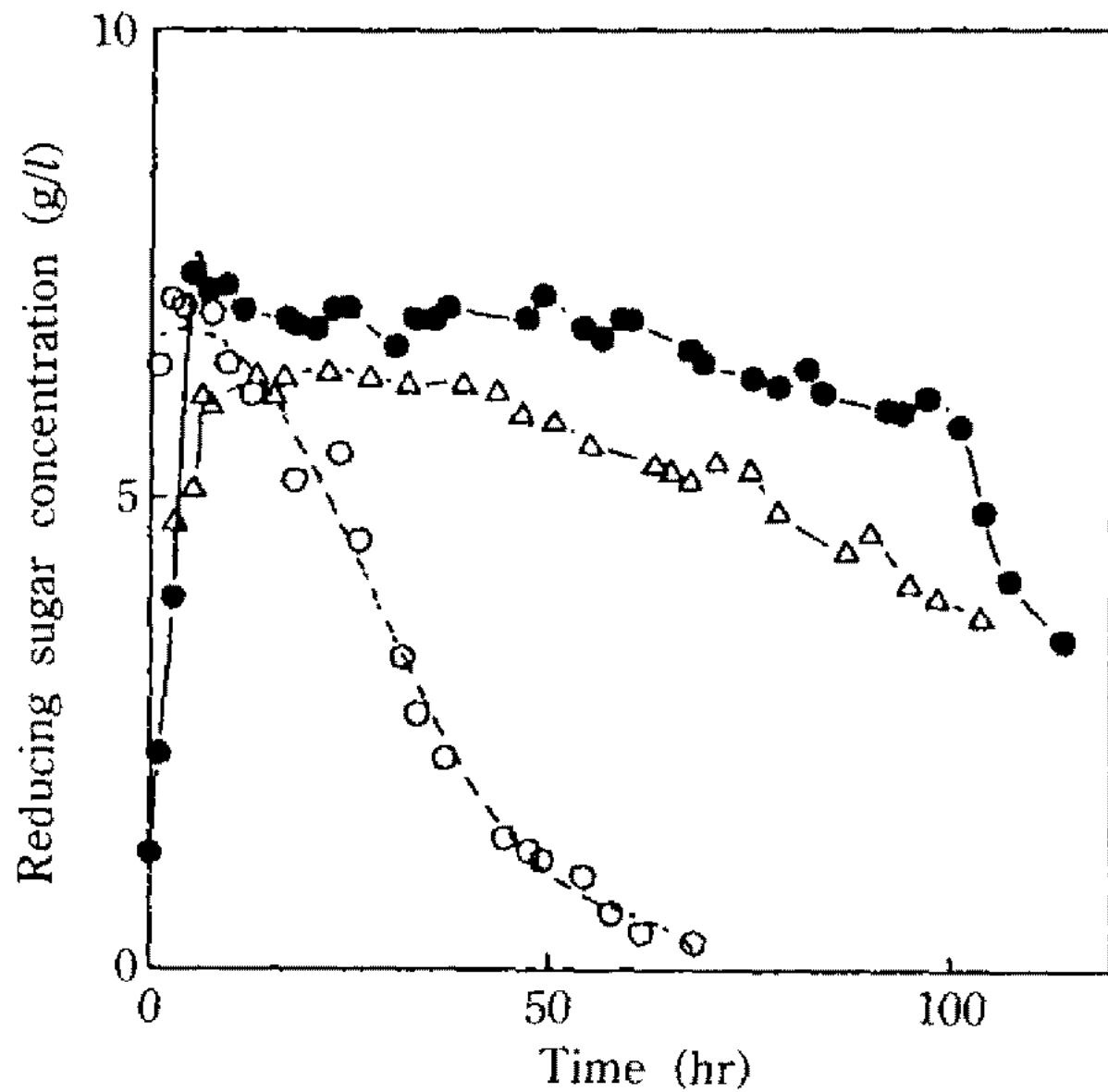


Fig. 6. Time course behaviour of glucose concentration in the continuous hydrolysis of soluble starch by α -amylase in aqueous two-phase systems and in pure water. The initial α -amylase activity was 2.3 U/ml.

●: Average molecular weight=6,000 and concentration=120 g/l for PEG, and average molecular weight=38,800 and concentration=100 g/l for DEX ($K=0.29$).
 △: Average molecular weight=6,000 and concentration=120 g/l for PEG, and average molecular weight=77,800 and concentration=100 g/l for DEX ($K=0.36$).
 ○: One phase system without PEG, DEX.

38,800를 사용하였을 때 α -amylase의 분배계수는 0.29이고, DEX 77,800을 사용하였을 때의 α -amylase의 분배계수는 0.36이었다. 한편 12%(w/v) PEG 6,000과 10%(w/v) DEX 38,800에서 2%(w/v) 포도당의 분배계수는 0.92를 보였는데 이는 포도당이 PEG상과 DEX상에서 고르게 분포됨을 알 수 있다. 이 system에 사용된 α -amylase의 초기 활성은 2.3 U/ml였다. 또한 PEG/DEX 수성 2상계를 사용하지 않고 수용액 상태의 단일상으로 α -amylase와 가용성 전분으로 연속적으로 반응시킨 것을 비교하여 Fig. 6에 같이 나타내었다. 여기서 PEG와 DEX를 사용하지 않고 수용액의 단일상에서 연속적으로 반응하였을 때 가용성 전분의 가수분해 정도는 2시간 30분에서 최대치를 보이다가 12시간 30분부터는 급격히 감소하기 시작함을 보였으며 약 55시간이 경과한 후에는 생성된 환원당이 거의 측정되지 않았다. 이는 단일상으로 인해 효소와 생성물과 미반응 기질이 settler내에 고르게 분포되어 settler 상부로부터 외부로 효소와 생성물들이 연속적으로 유출되어져서 55시간 부근에는

reactor내에 거의 효소가 존재하지 않는다고 보여지며 또한 수용액 상태에서의 효소활성이 PEG/DEX 수용성 고분자상에서 보다 변성된 점도 있으리라 생각된다.

DEX 38,800과 PEG 6,000을 사용한 수성 2상계로 연속적으로 반응을 수행하였을 때 생성된 환원당은, DEX 77,800과 PEG 6,000을 사용한 수성 2상계에서 반응을 수행한 것과 PEG/DEX을 사용하지 않은 수용액의 단일상에서 반응한 것보다 약 5시간부터 100시간에 걸쳐 큰 값을 나타내었다.

한편, 수성 2상계를 이용하여 연속적으로 반응을 수행할 때, 사용되는 α -amylase를 settler의 하부로 부터 reactor로 계속 재순환시키는 경우 약 100시간 이상 효소의 활성이 지속되었음을 Fig. 6에서 볼 수 있는데, 이는 α -amylase를 settler의 하층(DEX층)으로 모이게 하여 효소의 유출을 최대한 방지시키고 이를 reactor내에 재이용함에 기인한 것으로 생각되며, 특히 DEX 38,800일 때가 DEX 77,800일 때보다 환원당의 생성농도가 전반적으로 큰 것은 분배계수 (K)가 작아서 α -amylase가 DEX층에 더 모여 효소의 유출을 더 적게 할 수 있는데 기인한 것으로 생각된다.

요 약

Polyethylene glycol/dextran 수성 2상계에서 polyethylene glycol의 분자량과 농도가 증가할수록 체적비는 증가하고 분배계수는 감소하였다. 또한 dextran의 분자량이 증가할수록 체적비는 감소하고 분배계수는 증가하였다. 한편 dextran의 농도가 증가할수록 체적비와 분배계수는 감소하였다.

Bacillus amyloliquefaciens IFO 14141로부터 생산된 α -amylase를 이용하여 polyethylene glycol/dextran 수성 2상계에서 가용성 전분의 연속당화를 수행하였다. 이 system에서 미반응 starch와 α -amylase를 재이용할 수 있었다. 즉 α -amylase를 settler의 하층으로부터 reactor로 회수하여 재이용함으로써 α -amylase의 활성을 100시간 이상 유지할 수 있었다.

참고문헌

1. Beijerinck, M.W. 1896. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. *Zbl. Bakt.* 2: 627, 698-

- 699.
2. Kula, M.R., K.H. Kroner, and H. Hustedt. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction, pp. 73-118. *In* A. Fiechter(ed.), *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 24, Springer-Verlag, Berlin.
 3. Dobry, A. 1948. Sur l'incompatibilité des macromolécules en solution aqueuse. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **57**: 280-285.
 4. Dobry, A. and F. Boyer-Kawenoki. 1947. Phase separation in polymer solution. *J. Polym. Sci.* **2**: 90-100.
 5. Albertsson, P.-Å. 1956. Chromatography and partition of cells and cell fragments. *Nature* **177**: 771-774.
 6. Albertsson, P.-Å. 1986. *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.
 7. Walter, H., D.E. Brooks, and D. Fisher. 1985. *Partitioning in aqueous two-phase systems*. Academic Press Inc., London.
 8. Puziss, M. and C.-G. Hedén. 1965. Toxin production by *Clostridium tetani* in biphasic liquid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **7**: 355-366.
 9. Mattiasson, B., M. Souminen, E. Andersson, L. Häggström, P.-Å. Albertsson, and B. Hahn-Hägerdal. 1982. Solvent production by *Clostridium acetobutylicum* in aqueous two-phase systems, pp. 153-155. *In* I. Chibata, S. Fukui, and L.B. Wingard Jr. (ed.), *Enzyme Engineering*, Vol. 6, Plenum Publishing Corporation, New York.
 10. Persson, I., F. Tjerneld, and B. Hahn-Hägerdal. 1984. Semicontinuous cellulase production in an aqueous two-phase system with *Trichoderma reesei* Rutger C 30. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 415-418.
 11. Andersson, E., A.-C. Johansson, and B. Hahn-Hägerdal. 1985. α -Amylase production in aqueous two phase systems with *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **7**: 333-338.
 12. Albertsson, P.-Å., A. Cajarville, D.E. Brooks and F. Tjerneld. 1987. Partitions of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. *Biochim. Biophys. Acta.* **926**: 87-93.
 13. Kroner, K.H., H. Hustedt, and M.-R. Kula. 1982. Evaluation of crude dextran as phase-forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1015-1045.
 14. Mattiasson, B. 1983. Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology. *Trends in Biotechnol.* **1**(1): 16-20.
 15. Larsson, M., V. Arasaratnam, and B. Mattiasson. 1989. Integration of bioconversion and downstream processing: Starch hydrolysis in an aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 758-766.
 16. Hayashida, K., K. Kunimoto, F. Shiraishi, K. Kawakami, and Y. Arai. 1990. Enzymatic hydrolysis of soluble starch in a polyethylene glycol-dextran aqueous two-phase system. *J. Ferment. Bioeng.* **69** (4): 240-243.
 17. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3): 426-428.
 18. Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β , pp. 149-158. *In* S.P. Colowick, and N.O. Kaplan (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York.

(Received January 11, 1992)